

Micronúcleos y anormalidades nucleares en células de la mucosa bucal de mujeres mexicanas con factores de riesgo para cáncer cervicouterino: estudio piloto

Aurelio Flores-García,* Salvador Ruiz-Bernés,** Pedro Aguiar-García,*
 Verónica Benítez-Guerrero,** Martha Ofelia Valle-Solís,**
 Leonardo Daniel Molina-Noyola,*** Olivia Torres-Bugarín***

RESUMEN. En el mundo, el cáncer cervical es el cuarto cáncer más común en mujeres; en 2012 se estimaron 528,000 casos nuevos y 266,000 muertes. Una de las características es que pacientes con factores de riesgo presentan inestabilidad del genoma. Por esto, el objetivo fue evaluar la frecuencia de células micronucleadas (CMN) y anormalidades nucleares (AN) en células de mucosa bucal como medida de inestabilidad genómica en mujeres mexicanas con factores de riesgo para cáncer cervicouterino (CaCu). **Material y métodos:** Estudio de casos y controles no pareados. Se evaluó la frecuencia de CMN y AN —entre ellas, células binucleadas (BN), núcleos lobulados (NL), cromatina condensada (CC), cariorrexis (CR), cariolisis (CL)— en células de la mucosa bucal de mujeres mexicanas con y sin factores de riesgo (grupo control) para CaCu. Los resultados mostraron mayor frecuencia ($p < 0.05$) de CMN y NL (implican daño al DNA), BN (debido a daño en la citocinesis), así como CC+CR y CL (daño citotóxico) en las mujeres con factores de riesgo para CaCu que en las

Abreviaturas:

< 18IAST = Inicio de actividad sexual temprana, antes de los 18 años.
 ≥ 3ET = Tres o más embarazos a término.
 ≥ 3PS = Tres o más parejas sexuales.
 ≥ SP = Sobrepeso o mayor índice de masa corporal.
 AETS = Antecedentes de enfermedad de transmisión sexual.
 AFC = Antecedentes familiares de cáncer.
 AHO = Uso de anticonceptivos hormonales.
 AN = Anormalidades nucleares.

BN = Células binucleadas.
 CaCu = Cáncer cervicouterino.
 CC = Cromatina condensada.
 CL = Cariolisis.
 CMN = Células micronucleadas.
 CR = Cariorrexis.
 FR = Factores de riesgo.
 NL = Núcleos lobulados.

* Unidad Académica de Medicina, Universidad Autónoma de Nayarit, Tepic, Nayarit, México.

** Unidad Académica de Enfermería, Universidad Autónoma de Nayarit, Tepic, Nayarit, México.

*** Laboratorio de Evaluación de Genotóxicos del Programa Internacional de Medicina, Universidad Autónoma de Guadalajara.

Correspondencia:

Dra. en C. Olivia Torres-Bugarín

Laboratorio de Genética Toxicológica, Programa Internacional de Medicina. Universidad Autónoma de Guadalajara.

Av. Patria Núm. 1201, Lomas del Valle, 3.^a Sección, Apartado Postal 1-440, 44100, Guadalajara, Jalisco, México. Tel: 3648 8824, exts. 33152 o 33052.
 E-mail: oliviatorres@hotmail.com, olivia.torres@edu.uag.mx

Conflictos de intereses:

Todos los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses con respecto a la publicación de este artículo.

Recibido: 20 de abril de 2018. Aceptado con modificaciones: 9 de julio de 2018.

Este artículo puede ser consultado en versión completa en: www.medigraphic.com/elresidente

mujeres control. **Conclusión:** Este estudio sugiere que independientemente del número de factores de riesgo para CaCu, las pacientes sufren de inestabilidad genómica, genotoxicidad y citotoxicidad; por lo tanto, da la pauta para ampliar el tamaño de muestra y considerar todos los factores de riesgo descritos para CaCu para continuar con esta investigación.

Palabras clave: Cáncer cervicouterino, factores de riesgo, prueba de micronúcleos y anormalidades nucleares, genotoxicidad, citotoxicidad.

ABSTRACT. *Cervical cancer is the fourth most common cancer in women worldwide, with an estimated of 528,000 new cases and 266,000 deaths in 2012. The aim of the present study was to evaluate the genomic instability in women with risk factors by means of buccal micronucleus (MN) cytome assay. Material and methods: A case-control study. The frequencies of nuclear abnormalities—including MN, binucleates (BN), nuclear buds (NBUDs), condensed chromatin (CC), karyorrhexis (KR) and karyolysis (KL)—were evaluated in exfoliated buccal mucosa cells collected from 18 Mexican women with cervical cancer risk factors and 10 women without risk factors (control group). The results showed that frequencies of MNi, BN, NL, CC+KR y KL were significantly increased compared with the control group. Conclusion: Application of the buccal MN-cytome assay for the study of genomic instability in women with cervical cancer risk factors showed that both genotoxic and cytotoxic effects can be evaluated in this study group.*

Key words: *Cervical cancer, risk factors, buccal micronucleus cytome assay, genotoxicity, cytotoxicity.*

INTRODUCCIÓN

El CaCU es el cuarto cáncer más común en mujeres a nivel mundial; en 2012, GLOBOCAN estimó 528,000 casos nuevos y 266,000 muertes.¹ Es de destacar que el 87% de las muertes por este tipo de cáncer ocurre en las regiones menos desarrolladas. Específicamente en México, el CaCu representa un problema de salud pública, ya que en mujeres es la segunda causa de muerte por cáncer; por ejemplo, en el año 2013 se registraron 3,771 defunciones entre mujeres de 25 años y más.²

El principal factor etiológico de casi todos los cánceres del cuello de útero es el papiloma-virus humano (VPH); incluso está identificado como de alto riesgo.^{3,4} Los factores de riesgo para el desarrollo de CaCu son la edad, haber tenido dos o más parejas sexuales, el inicio de la actividad sexual antes de los 18 años, múltiples embarazos, antecedentes de enfermedades de transmisión sexual o de familiares con cáncer, depresión inmune, baja escolaridad, tabaquismo y consumo de alcohol.⁵⁻⁷ La vacunación contra el VPH es el método de prevención primaria para cáncer cervical; no obstante, su impacto será observado hasta dentro de dos o tres décadas. En consecuencia, la prevención secundaria debe ser fortalecida, en particular en los países en desa-

rrollo, donde el CaCu está entre las causas de mortalidad relacionadas con cáncer en mujeres.⁸

Por otro lado, el cáncer es una enfermedad genética asociada con daño cromosómico e inestabilidad genómica. Un método utilizado con frecuencia, bien aceptado y mínimamente invasivo para monitorear daño genético en poblaciones en riesgo es la prueba de micronúcleos en células exfoliadas de la mucosa bucal,⁹⁻¹¹ con la ventaja de que al utilizar este tejido, también es factible cuantificar de manera paralela otras anormalidades nucleares (AN), como células micronucleadas (CMN) y núcleos lobulados (NL; reflejan daño al DNA), células binucleadas (BN; daño a la citocinesis) y cromatina condensada (CC), cariorrexis (CR) y cariolisis (CL), que son indicadoras de citotoxicidad.^{9,11,12} En fechas recientes esta técnica está siendo utilizada de manera exponencial debido a su elevada confiabilidad para la detección de daño genotóxico e inestabilidad genómica en humanos y a que la mayoría de los tumores son de origen epitelial.¹³

Es importante señalar que se observó mayor frecuencia de CMN en células de la mucosa bucal (CMB) de pacientes con cáncer primario (incluyendo cáncer cervical) comparadas con las de sujetos control,¹⁴ así como en mujeres con cáncer invasivo y lesiones intraepiteliales escamosas de bajo y alto grado.¹⁵ Por otra parte,

está descrita en células exfoliadas de cérvix correlación positiva entre la frecuencia de CMN y los cambios de lesiones premalignas a cáncer.¹⁶

Asimismo, la prevalencia de CMN en células cervicales uterinas exfoliadas fue más elevada en pacientes con uno o más factores de riesgo para Ca cervical que en mujeres sin factores de riesgo.^{17,18} Sin embargo, no hay datos acerca de CMN y AN en células exfoliadas de mucosa bucal de pacientes con factores de riesgo para CaCu.

El objetivo fue evaluar la frecuencia de CMN y AN en células de mucosa bucal como medida de inestabilidad genómica en mujeres mexicanas con factores de riesgo para CaCu.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aspectos éticos. Se explicaron los objetivos a cada participante que fue invitado a formar parte del estudio, se les aplicó un cuestionario, se realizó un raspado gentil de muestra de la mucosa bucal y firmaron consentimiento informado, mismo que autorizaba a tomar la muestra, revisar el expediente, usar sus datos con fines de investigación y publicar los resultados obtenidos respetando su anonimato. El proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética y Ética en Investigación y cuenta con registro (HC 20183005-04) ante el Departamento de Calidad, Educación e Investigación en Salud del Hospital Civil «Dr. Antonio González Guevara».

Diseño. Estudio de casos y controles no pareados.

Población de estudio. La captación de los participantes se llevó a cabo en el Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Civil «Dr. Antonio González Guevara» de Tepic, Nayarit, México. Se trabajó con mujeres de entre 21-56 años de edad con (grupo-casos) y sin (grupo-control) factores de riesgo para CaCu; estas últimas fueron personas aparentemente sanas con laboratoriales básicos (biometría hemática, química sanguínea y examen general de orina) normales y eran familiares de las mujeres seleccionadas con factores de riesgo.

Los factores de riesgo (FR) que se consideraron fueron el inicio temprano de la actividad

sexual —antes de los 18 años— (< 18IAST), tres o más parejas sexuales (≥ 3 PS), uso de anticonceptivos hormonales (AHO), antecedentes de enfermedad de transmisión sexual (AETS), antecedentes familiares de cáncer (AFC), tres o más embarazos a término (≥ 3 ET), sobrepeso o mayor índice de masa corporal (\geq SP).

Todas las participantes fueron entrevistadas para obtener información personal y se les pidió responder un cuestionario acerca de sus hábitos de fumar, consumo de alcohol y café, estado de salud, edad, hábitos alimentarios, lactancia, consumo de drogas, anticonceptivos, antioxidantes, infecciones virales en los últimos tres meses, vacunación y enfermedades hereditarias. Se excluyeron del estudio aquellas participantes en quienes se identificó exposición a algún agente inductor de CMN o AN.

Toma, procesamiento y análisis de muestras. De cada participante incluida en el estudio se tomaron dos muestras de células de la mucosa bucal (una de cada carrillo), mismas que se obtuvieron mediante un raspado gentil con un portaobjetos de bordes romos después de un suave enjuague bucal con agua potable. Con el material obtenido se realizaron dos frotis sobre dos portaobjetos codificados.

Cada frotis se dejó secar al aire libre, se fijó en etanol al 80% por 48 horas y se tiñó con anaranjado de acridina (Sigma-Aldrich, México), 0.02 mg/mL de *buffer* de fosfatos (pH 7.4).¹¹ Con la ayuda de un microscopio Carl Zeis Axio Scope A1 (Gottingen, Alemania) y objetivo 100x se contabilizaron 2,000 células para establecer la frecuencia de CMN y de AN (BN, NL, CC, CR y CL), mismas que fueron identificadas acorde con los criterios establecidos por Thomas, Torres-Bugarín, Bolognesi y sus respectivos colaboradores.^{9,11,12} Los resultados están expresados en 1,000 células.

Criterios de identificación de CMN y AN

- Célula normal (CN): el núcleo está uniformemente teñido, es redondo u oval, no contiene ningún otro cuerpo o estructura además del núcleo.

- Células micronucleadas (CMN): presencia de un núcleo principal y una o más pequeñas estructuras nucleares (entre 1/3 y 1/16 del núcleo principal) con la misma intensidad, textura y plano focal que el núcleo.
- Células binucleadas (BN): son células que contienen dos núcleos principales, con morfología y tinción similar.
- Cariorrexis (CR): el núcleo se caracteriza por agregación de la cromatina nuclear.
- Cromatina condensada (CC): estas células tienen núcleos teñidos con intensidad, con regiones condensadas o cromatina agregada que exhibe un patrón nuclear moteado o estriado.
- Núcleo lobulado o prolongación nuclear, Brokeneggs (NL-BE): núcleo con una contricción.
- Núcleo picnótico (PN): es un núcleo pequeño, con alta densidad de material nuclear uniforme, pero intensamente teñido.
- Cariólisis (CL): en ellas el núcleo está vacío por completo; es decir, hay ausencia total de DNA.

Evaluación estadística. Se aplicó la prueba t-Student para muestras independientes para analizar la edad entre grupos; para el resto de las variables se obtuvo el *odds ratio* (OR) y se utilizó la prueba U de Mann-Whitney; se consideró el valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. Las pruebas se llevaron a cabo mediante el Programa Estadístico para Ciencias Sociales (versión 16.0; SPSS Inc., Chicago Illinois, EUA); para las figuras se utilizó el programa GraphPad Prism 7.

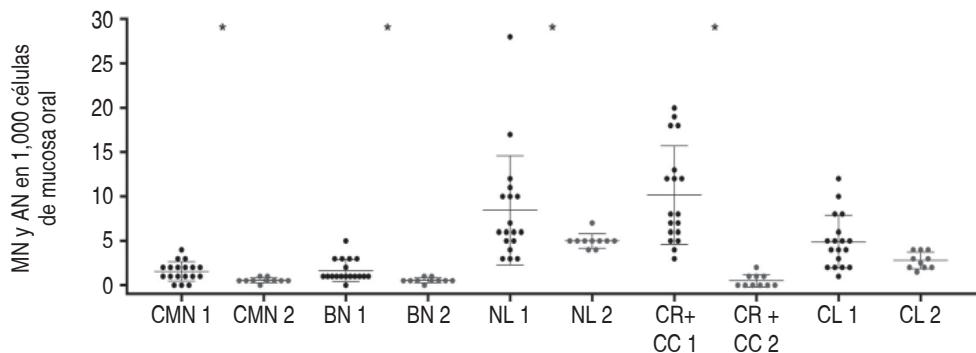
RESULTADOS

Se colectaron 18 muestras de pacientes con factores de riesgo para CaCu y 10 de mujeres sin factores de riesgo; en el *cuadro I* se puede

Cuadro I. Micronúcleos y anomalías nucleares asociados a factores de riesgo para cáncer cervicouterino.

Parámetros	n	%	Daño al DNA		BN	Daño en citocinesis	CR+CC	Muerte celular
			MN	NL				
Controles	10	100.0	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.7	2.8 ± 0.9	5.0 ± 0.8	
OR			9 (1-108)*	18 (2-210)*	153 (7-1698)*	4.7 (1-20)	18 (2-210)*	
Casos	18	100.0	**1.6 ± 1.1	**1.6 ± 1.2	**10.2 ± 5.5	*4.9 ± 2.3*	8.4 ± 6.1	
Factores de riesgo								
< 18IAST	8	44.4	**1.9 ± 0.8	**1.2 ± 0.7	**10.1 ± 4.6	5.9 ± 3.7	9.1 ± 8.3	
≥ 3PS	4	22.2	*1.75 ± 0.9	0.7 ± 0.5	**12.2 ± 7.3	6.0 ± 4.2	*11.2 ± 11.2	
AHO	12	67.2	*1.9 ± 1.2	**1.5 ± 1.3	**10.4 ± 6.1	*5.7 ± 3.2	9.3 ± 7.3	
AETS	4	22.2	*1.7 ± 0.9	*1.5 ± 1.0	**11.2 ± 5.7	5.7 ± 4.3	*11.5 ± 11.0	
AFC	7	39.2	*1.7 ± 0.9	**1.0 ± 0.0	**10.1 ± 5.4	6.0 ± 4.0	9.4 ± 8.8	
≥ 3ET	6	33.6	*2.0 ± 1.4	**2.0 ± 1.1	**12.8 ± 5.4	4.7 ± 2.2	*10.0 ± 4.4	
≥ SP	14	78.4	*1.5 ± 0.9	**1.7 ± 1.3	**9.5 ± 5.3	5.1 ± 3.3	8.2 ± 6.9	
Suma de factores								
2 FR	8	44.4	1.0 ± 1.3	**2.4 ± 1.4	**9.7 ± 6.3	3.2 ± 1.7	*7.2 ± 2.8	
3 FR	4	22.2	**1.7 ± 0.5	1.2 ± 1.2	**11.0 ± 5.7	**5.5 ± 1.7	9.0 ± 5.9	
4 FR	4	22.2	**2.0 ± 0.8	*1.0 ± 0.0	**7.5 ± 3.1	*6.5 ± 3.1	6.0 ± 4.2	
5 FR	1	5.6	2.0	1.0	12.0	2.0	6.0	
6 FR	1	5.6	3.0	1.0	19.0	12.0	28.0	

Media + desv. CMN = Células micronucleadas, BN = Células binucleadas, NL = Núcleos lobulados, CR+CC = Cariorrexis + cromatinas condensadas, CL = Cariólisis; OR (*Odds ratio*-razón de momios); se aplicó la prueba U de Mann-Whitney al comparar con el control; * $p < 0.05$ o ** $p < 0.005$, < 18IAST = Inicio de actividad sexual temprana < 18 años, > 3PS = Tres o más parejas sexuales, AHO = Anticonceptivos hormonales, AETS = Antecedentes de enfermedad de transmisión sexual, AFC = Antecedentes familiares de cáncer, ≥ 3ET = Tres o más embarazos a término, ≥ SP = Sobrepeso o más índice de masa corporal, y FR = Factores de riesgo.



1 = Casos y 2 = Controles, CMN = Células micronucleadas, BN = Células binucleadas, NL = Núcleos lobulados, CR+CC = Cariorrexis + cromatinas condensadas, CL = Cariólisis. Prueba U de Mann-Whitney. * p < 0.05.

Figura 1. Micronúcleos y anormalidades nucleares en células de la mucosa bucal de mujeres mexicanas con factores de riesgo para cáncer cervicouterino.

observar que la mayoría presentó sólo dos de los factores de riesgo seleccionados; sólo una de ellas tuvo seis factores de riesgo. Al comparar ambos grupos, en el promedio de edades no se identificó diferencia significativa (casos: 35.0 ± 11.7 , controles: 36.6 ± 3.6); en los casos, el índice de masa corporal (IMC) fue mayor (casos: 27.1 ± 4.4 ; controles: 22.5 ± 1.6 ; **p < 0.005) y nivel socioeconómico menor (*p < 0.05).

Al analizar la frecuencia de MN y AN, como se observa en el cuadro I y la figura 1, la frecuencia fue mayor en los casos (p < 0.05); en función de los factores de riesgo, se pudo identificar que todos influyen en la formación de estos biomarcadores; incluso, al considerar el número de factores de riesgo presentes en cada paciente, fue indistinto cuántos factores estuvieran presentes: en la mayoría de los casos, la frecuencia de CMN y AN se observó por arriba de los controles (p < 0.05). Destacó la paciente con los seis factores de riesgo, quien presentó la mayor frecuencia de CMN y AN. En todas las variables se encontró asociación, si bien el grado de la misma fue variable: la AN que obtuvo mayor grado fue BN, con un OR de 153 (7-71698) p > 0.0001 (Cuadro I).

DISCUSIÓN

Si bien en este trabajo no se consideran todos los factores de riesgo para CaCu y el ta-

maño de muestra fue pequeño, cabe señalar que fue el primero en evaluar inestabilidad genómica mediante la prueba de micronúcleos en células de la mucosa bucal de pacientes con factores de riesgo para CaCu, y que da la pauta para continuar con este estudio, porque (como se ve en el cuadro I) todas las pacientes con factores de riesgo presentaron inestabilidad genómica. Por otro lado, es relevante señalar que la paciente con más factores de riesgo fue precisamente quien tuvo mayor frecuencia de CMN y AN; por lo tanto, esta prueba podría ser la herramienta que permite identificar a las personas más vulnerables para vigilarlas más de cerca, ya que la inestabilidad genómica es un factor de riesgo para todos los tipos de cáncer (inclusivo el CaCu). Por lo tanto, es importante continuar con esta investigación.

CONCLUSIÓN

Este estudio sugiere que las pacientes con factores de riesgo para CaCu sufren de inestabilidad genómica, genotoxicidad y citotoxicidad debido a que presentaron mayor frecuencia de CMN y AN que el grupo control. Por lo tanto, da la pauta para continuar con esta investigación, ampliar el tamaño de muestra y considerar todos los factores de riesgo descritos para CaCu.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136 (5): E359-386.
2. Gobierno de México. Estadísticas de cáncer de mama y cáncer cérvico-uterino. México: Gobierno de México, Secretaría de Salud; 2015.
3. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003; 89 (1): 101-105.
4. Bosch FX, De Sanjosé S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; 31: 3-13.
5. Hernández-Hernández DM, Apresa-García T, Patlán-Pérez RM. Panorama epidemiológico del cáncer cervicouterino. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2015; 53 (2): S154-161.
6. Gobierno de México. Cáncer de cuello uterino. Prevención y detección oportuna. México: Gobierno de México, Secretaría de Salud; 2015.
7. Mohar-Betancourt A, Reynoso-Noverón N, Armas-Texta D, Gutiérrez-Delgado C, Torres-Domínguez JA. Cancer trends in Mexico: essential data for the creation and follow-up of public policies. *J Glob Oncol*. 2017; 3 (6): 740-748.
8. Torres-Ibarra L, Lazcano-Ponce E, Franco EL, Cuzick J, Hernández-Ávila M, Lorincz A et al. Triage strategies in cervical cancer detection in Mexico: methods of the FRIDA Study. *Salud Pública Mex*. 2016; 58: 197-210.
9. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*. 2009; 4 (6): 825-837.
10. Majer B, Laky B, Knasmüller S, Kassie F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutat Res*. 2001; 489 (2): 147-172.
11. Torres-Bugarín O, Zavala-Cerna MG, Nava A, Flores-García A, Ramos-Ibarra ML. Potential uses, limitations, and basic procedures of micronuclei and nuclear abnormalities in buccal cells. *Dis Markers*. 2014; 2014: 956835.
12. Bolognesi C, Bonassi S, Knasmüller S, Fenech M, Bruzzone M, Lando C et al. Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: a systematic review and metanalysis. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2015; 766: 20-31.
13. Cairns J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature*. 1975; 255 (5505): 197-200.
14. Nersesyan AK, Vardazaryan NS, Gevorgyan AL, Arutyunyan RM. Micronucleus level in exfoliated buccal mucosa cells of cancer patients. *Archive of Oncology*. 2002; 10 (1): 35-36.
15. Leal-Garza CH, Cerdá-Flores RM, Leal-Elizondo E, Cortés-Gutiérrez EI. Micronuclei in cervical smears and peripheral blood lymphocytes from women with and without cervical uterine cancer. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2002; 515 (1): 57-62.
16. Nersesyan AK. Possible role of the micronucleus assay in diagnostics and secondary prevention of cervix cancer: a minireview. *Cytology and Genetics*. 2007; 41 (5): 317-318.
17. Campos LM, Dias FL, Antunes LM, Murta EF. Prevalence of micronuclei in exfoliated uterine cervical cells from patients with risk factors for cervical cancer. *Sao Paulo Med J*. 2008; 126 (6): 323-328.
18. Aires GM, Meireles JR, Oliveira PC, Oliveira JL, Araújo EL, Pires BC et al. Micronuclei as biomarkers for evaluating the risk of malignant transformation in the uterine cervix. *Genet Mol Res*. 2011; 10 (3): 1558-1564.